

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2010)03-0172-04

马铃薯茎尖脱毒培养影响因素研究

王 娟, 汪仲敏, 王瑞英, 杨俊丰, 潘晓春*, 姚宴红

(甘肃省定西市旱作农业科研推广中心, 甘肃 定西 743000)

摘 要: 以马铃薯茎尖为外植体, 通过组织培养研究了不同的茎尖大小、不同浓度和配比的细胞分裂素和生长素对脱毒效果的影响。结果表明: 茎尖越小, 脱毒率越高但成活率和成苗率越差; 茎尖越大, 成活率和成苗率高但脱毒率差。6 种培养基中以 MS + NAA 0.1 mg·L⁻¹ 效果最好, 成苗率为 33.75%, 为本试验中茎尖诱导分化成苗的最优培养基。

关键词: 马铃薯; 茎尖培养; 影响因素

Influencing Factors of Potato Meristem Culture for Virus Elimination

WANG Juan, WANG Zhongmin, WANG Ruiying, YANG Junfeng, PAN Xiaochun, YAO Yanhong

(Dingxi Dry Farming Research and Extension Center, Dingxi, Gansu 743000, China)

Abstract: The factors, including meristem size and concentration and proportioning of auxin and cytokinins in medium, were studied for efficacy of virus elimination. The smaller the meristem size, the higher the virus-free regenerated plantlet percentage, however, the survival percentage of inoculated meristem and percentage of regenerated plantlets were decreased. On the other side, the larger the meristem size, the higher the survival percentage of inoculated meristem and percentage of regenerated plantlets, but the efficacy of virus elimination was poor. Of six media tested the medium MS + NAA 0.1 mg·L⁻¹ was the best medium for differentiation, with the percentage of regenerated plantlets being 33.75%.

Key Words: potato; meristem culture; factor

收稿日期: 2010-03-08

作者简介: 王娟(1980-), 女, 研究员, 主要从事马铃薯组织培养及遗传育种研究。

* 通信作者: 潘晓春, 副研究员, 主要从事马铃薯遗传育种研究, E-mail: pxc0820@126.com。

进行 N、P、K 与产量的回归分析, 成功率较高, 因此最佳施肥量均是通过一元二次模型获得的。

阴山南麓区虽然是内蒙古的重要马铃薯产区, 而且多数为旱作栽培, 多年来缺乏基本的指导施肥的依据, 虽然过去有人曾建立了包括该地区在内的马铃薯推荐施肥指标体系^[2,3], 但其是用于指导灌溉马铃薯施肥的。因此, 本指标的建立将成为阴山南麓旱作马铃薯的主要施肥依据。

关于土壤氮素含量的分级指标, 传统的方法是依据碱解氮进行^[2]。由于用碱解氮表述速效氮含量存在缺陷, 而基层农技推广部门难以获得土壤 N_{min}, 所以本文采用了土壤全氮作为分级指标。

对于钾来说, 阴山南麓土壤钾含量相对丰富, 试验中低钾水平的地块偏少, 由此得出的低肥力等级的实际养分临界值以及推荐施肥量是否能够有效

指导施肥实践, 尚需进行试验检验。

[参 考 文 献]

- [1] 张福锁. 测土配方施肥技术要览[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2006: 93-110.
- [2] 高炳德. 马铃薯氮肥施用技术的研究[J]. 马铃薯杂志, 1988, 2(2): 85-92.
- [3] 中国农业百科全书. 作物卷[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 34-35.
- [4] 俞海, 黄季焜, Scott Rozelle, 等. 中国东部地区耕地土壤肥力变化趋势研究[J]. 地理研究, 2003, 22(3): 381, 387.
- [5] 陈新平, 张福锁. 通过“3414”试验建立测土配方施肥指标体系[J]. 中国农技推广, 2006, 22(4): 36-39.
- [6] 付莹莹, 同延安, 李文祥, 等. 陕西关中灌区冬小麦土壤养分丰缺指标体系的建立[J]. 麦类作物学报, 2009, 29(5): 897-900.
- [7] 孙义祥, 郭跃升, 于舜章, 等. 应用 3414 试验建立冬小麦测土配方施肥指标体系[J]. 植物营养与肥料学报, 2009, 15(1): 197-203.

甘肃省定西市由于海拔高, 气候冷凉, 是马铃薯脱毒种薯和良种扩繁的最佳区域, 也是中国马铃薯种植的最佳适宜区之一, 马铃薯产业已成为当地的主导产业, 在促进当地经济发展方面起着重要的作用。但近年来由于马铃薯在种植过程中容易感染病毒致使品种退化严重, 直接影响了马铃薯的品质和产量, 严重阻碍了马铃薯的生产和利用及当地农民经济收入。应用组织培养方法特别是茎尖组织培养来获取脱毒苗从而达到增产增收效果, 已成为当前解决马铃薯品种退化的主要技术, 很多人在这方面做了大量的研究, 也取得了很多成果^[1-4]。为了解决当地马铃薯主导品种退化快的问题, 我们在组织培养方面做了大量的研究, 目的是为了获得某些优良品种的脱毒苗, 快速繁殖出脱毒种薯, 提高产量和质量, 延缓品种退化, 促进农民增收。本文通过对马铃薯茎尖大小, 培养基成分对当前当地种植前景较好的 4 个品种进行脱毒效果的研究, 进一步探讨茎尖组织培养的方法, 以期能够提高品种脱毒率。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验材料为当地主要推广品种定薯 1 号、新大坪、陇薯 3 号及定西市旱农中心育种组培育的新品系 0302-43, 供试材料全部由该中心马铃薯育种组提供。

1.2 试验方法

1.2.1 试验外植体消毒

取通过休眠期的各品种种薯在室内于较低温度和较强光照下促其生芽。选择时选取大小合适、叶片尚未打开的顶芽或侧芽(0.5~0.8 cm), 放在烧杯中用纱布罩住, 在自来水下冲洗 1 h, 然后用纱布吸干水分置于超净工作台上; 或者先将种薯洗干净, 然后将种薯置于自来水下冲洗 2 h, 后在超净工作台下切取合适的茎尖进行剥离。

剥离茎尖前, 先将冲洗过的芽放在无菌水中冲洗 2~3 次, 然后用 75% 酒精消毒 30~60 s, 后用 10% NaClO₄ 溶液消毒 8~10 min, 再用无菌水冲洗 3~4 次, 放在湿润的无菌滤纸上待用。

1.2.2 外植体大小

茎尖培养存活率的临界值大小应为一个茎尖分生组织带 1~2 个叶原基, 大小约为 0.2~0.3 mm。取

各品种带有 1~2 个叶原基的粗壮顶芽就可获得大小合适的离体茎尖。解剖时必须注意使茎尖暴露的时间越短越好, 同时在材料下面点上一块无菌的滤纸。在解剖镜下仔细剥离茎尖, 逐层剥去幼叶, 直到露出圆滑的生长点, 用解剖针切取带 1~2 个叶原基的茎尖, 视茎尖状况分为 0.1~0.3 mm、0.3~0.6 mm、0.6~1.0 mm, 且尽量少带生长点附近的邻近组织, 分别接种到装有不同培养基的试管中, 每个试管接 1 个茎尖。各品种均以单株编号。

1.2.3 培养基配方

大的外植体(0.5 mm 或更长)在不含生长调节物质的培养基中也能产生一些完整的植株, 但一般来说, 含有少量的(0.1~0.5 mg·L⁻¹)生长素或细胞分裂素或者二者兼有常常是有利的。广泛使用的是 NAA 和 IAA^[5]。根据我们 2008 年的试验研究结果, 生长素在茎尖组织培养方面效果要优于细胞分裂素, 所以本试验中培养基配方多采用生长素 NAA(表1)。

表 1 茎尖培养基配方

Table 1 Culture media used for meristem culture

编 号 Code	培养基配方(mg·L ⁻¹) Culture medium
CK	MS
Y-1	MS+6-BA 0.5
Y-2	MS+NAA 0.05
Y-3	MS+NAA 0.1
Y-4	MS+NAA 0.5
Y-5	MS+6-BA 0.5+NAA 0.1

注: 每升培养基中食用白糖含量 3%, 琼脂 0.45%, pH = 5.8。

Note: 3% white sugar and 0.45% agar were included in 1 L medium, pH = 5.8.

1.2.4 培养条件

马铃薯茎尖培养的温度一般要求室温在(25±2℃)中培养。光照强度是 2 000~3 000 lx, 光照时间每天 14~16 h, 相对湿度 70%~80%, 30~40 d 后, 观察茎尖明显伸长, 叶原基形成可见小叶, 然后转到相同培养基或 MS 培养基中。接种 45 d 后统计成活率, 90~120 d 后统计成苗率。其中成活指茎尖发育为可见的绿点, 成活率为成活茎尖个数与接种茎尖个数之比; 成苗指成活茎尖长出带有两个以上的叶片的小植株, 成苗率为成苗茎尖个数与接种茎尖个数之比^[6]。脱毒率为成苗茎尖中经病毒检测后不带病毒的茎尖个数与成苗茎尖个数之比。

1.2.5 病毒鉴定

茎尖分化成苗后切繁，选取生长健壮的苗送相关部门检测病毒，所检项目为 PVX、PVY、PVS、PLRV。

2 结果与分析

2.1 茎尖大小对培养效果的影响

采用 Y-2 培养基研究 4 个品种茎尖大小对成活率、成苗率及脱毒效果的影响。表 2 结果表明茎尖越小，成活率和成苗率越差，但脱毒率越高。在 0.1~0.3 mm 范围内 4 个品种除新大坪没有成苗外，其他 3 个品种能成苗但成苗率差，其脱毒率可达到 50%~100%。茎尖越大，成苗率越高，但

脱毒率越低，如在 0.6~1.0 mm 范围内，定薯 1 号成苗率达 62.5%，而脱毒率只有 10.0%。为了达到成苗和脱毒的双重效果，茎尖大小可以采用 0.3~0.6 mm 之间，4 个品种成苗率在 18.8%~40.0%，脱毒率在 33.3%~66.7%。试验中还发现，取顶芽的成苗率要高于侧芽，但脱毒率之间差异不明显；不带叶原基的茎尖基本不能成活，带两个叶原基的成活率相对要高。4 个品种中 PVX、PVY、PLRV 3 种病毒的脱毒率为 100%，新大坪带有 PVS 病毒。

2.2 不同培养基对培养效率的影响

表 3 和表 4 结果表明：剥离茎尖在 Y-3 和 Y-4 培养基上生长状况相对较好，CK 诱导的茎尖生长状况最差。6 种培养基中以 Y-3 培养基成苗率最

表 2 茎尖大小对成活率、成苗率及脱毒效果的影响

Table 2 The effect of meristem size on the survival percentage of inoculated meristem, the percentage of regenerated plantlets, and and the percentage of virus-free plantlets

茎尖大小 (mm) Meristem size	品 种 Variety	接种数 (No.) Inoculated meristem	成活数 (No.) Survived meristem	成活率 (%) Survival percentage	成苗数 (No.) Regenerated plantlets	成苗率 (%) Percentage of regenerated plantlets	脱毒率 (%) Percentage of virus-free plantlets
0.1~0.3	定薯 1 号	16	2	12.5	2	12.5	50.0
	新 大 坪	12	0	0	0	0	0
	陇薯 3 号	12	3	25.0	3	25.0	66.7
	0302-43	20	4	20.0	3	15.0	100.0
0.3~0.6	定薯 1 号	16	5	31.3	3	18.8	33.3
	新 大 坪	12	3	25.0	3	25.0	66.7
	陇薯 3 号	12	5	41.7	4	33.3	50.0
	0302-43	20	10	50.0	8	40.0	50.0
0.6~1.0	定薯 1 号	16	10	62.5	10	62.5	10.0
	新 大 坪	10	6	60.0	5	50.0	0
	陇薯 3 号	10	8	80.0	6	60.0	16.7
	0302-43	20	17	85.0	15	75.0	47.0

表 3 不同培养基上茎尖分化生长情况

Table 3 The differentiation of meristem in different culture media

培养基 Medium	茎尖生长情况及成苗特征 Growth and characteristics of the meristem
CK	接种 7~15 d 茎尖有转绿现象，后变淡黄，40~50 d 后变白枯萎。
Y-1	接种 10~15 d 后茎尖为黄绿色，能成苗者在 120~150 d 后成苗，否则干死。
Y-2	接种 15~20 d 后转为淡绿色，能成苗者在 40~50 d 后转为绿色，茎伸长，不能成苗者 90 d 后叶原基极度伸长发黄，但生长点绿，而后转黄。
Y-3	接种 7~15 d 后茎尖为绿色，40~50 d 后有芽，开始生长，能成苗者 90~120 d 后成苗。
Y-4	接种 10~20 d 后茎尖淡绿色膨大，50~60 d 后有芽，能成苗者 100~140 d 后成苗。
Y-5	接种后 20 d 有淡绿色愈伤组织出现，能成苗者在 60 d 后生根，75~90 d 后成苗。

高，说明在 MS 培养基的基础上添加 NAA 对 4 个品种茎尖分化成苗有很好的促进作用。在不含任何生长调节物质的 CK 培养基即 MS 培养基上，茎尖的成苗率最低，只有 0302-43 成苗 1 株，其他 3 个品种均无一成苗。单纯添加 6-BA 的 Y-1 培养基成苗率也较差，在此基础上与 NAA 配合使用的 Y-5 培养基效果要优于单纯使用 6-BA，但不及单纯使用 NAA (Y-2, Y-3, Y-4)。Y-5 培养基在一定程

度上能诱导愈伤组织的形成和分化，说明 6-BA 和 NAA 可产生愈伤组织，这与前人的报道一致^[7-8]。单纯使用 6-BA 或者 NAA 不能诱导产生愈伤组织。定薯 1 号的最适培养基为 Y-3，其次为 Y-2；新大坪和陇薯 3 号适合在 Y-3 和 Y-4 培养基上分化，且 Y-3 的效果优于 Y-4；0302-43 在 6 种培养基上均能成苗，说明该品种茎尖组织活力旺盛，培养条件宽广，适应性强。

表 4 不同培养基对茎尖培养效率的影响

Table 4 Effect of culture medium on the culture efficiency

培养基 Culture medium	接种数(No) Inoculated meristem	成苗数(No) Regenerated plantlets				成苗率(%) Percentage of regenerated plantlets			
		定薯 1 号 Dingshu1	新大坪 Xindaping	陇薯 3 号 Longshu3	0302-43	定薯 1 号 Dingshu1	新大坪 Xindaping	陇薯 3 号 Longshu3	0302-43
CK	20	0	0	0	1	0	0	0	5.0
Y-1	20	0	1	1	2	0	5.0	5.0	10.0
Y-2	20	5	1	1	5	25.0	5.0	5.0	40.0
Y-3	20	7	8	7	5	35.0	40.0	35.0	25.0
Y-4	20	1	5	6	3	5.0	25.0	30.0	15.0
Y-5	20	2	1	1	2	10.0	5.0	5.0	10.0

3 讨 论

影响马铃薯茎尖培养产生无病毒植株的因素有种薯质量、茎尖大小、培养基类型、培养条件和病毒种类^[9]。种薯最好在田间株选，并结合热处理。茎尖越小，成活率和成苗率越差，但脱毒率越高；茎尖越大，成苗率越高，但脱毒率越低。实际操作中，如果切取茎尖太小，成活率太低，失去了实际应用的价值。为了保证成苗和脱毒，也可以通过变通的方法，结合田间株选，选取生长健壮没有病害症状的种薯，剥取茎尖大小在 0.4~0.8 mm 之间，带两个叶原基，成苗后再对植株反复切取 0.4 mm 以下的茎尖培养，也能达到去除病毒的效果。

不同的植物生长调节剂，对茎尖发育成苗有很大的影响。细胞分裂素有利于离体茎尖分生组织分化的方向一般用 6-BA 者较多。生长素能够促进茎尖根的分化，主要使用的是 NAA。一定浓度的 6-BA 和 NAA 配合使用能诱导产生愈伤组织，但绝大多数学者都反对通过愈伤组织途径脱除马铃薯病毒，因为此途径会产生遗传变异。在培养过程中一般马铃薯茎尖组织有几种生长发育类型，应根据不同的类型，改变生长调节物质主要是生长素的浓度

及处理时间。另外去除病毒的难易还受其他条件的影 响，对于同一个品种不同的地区，不同的培养条件有不同的结果，对于某个品种最优培养基要建立在大量的试验研究基础之上，需要经过大量的试验确定，不能一概而论。

[参 考 文 献]

- [1] 张辅达, 孙宪昀. 马铃薯茎尖培养脱毒研究进展[J]. 中国马铃薯, 2004, 18(1): 35-38.
- [2] 丁运华, 李桥文, 陈兆贵. 马铃薯茎尖试管苗及微型试管薯繁育的影响因子研究[J]. 中国马铃薯, 2008, 22(2): 91-93.
- [3] 郝文胜, 赵永秀, 赵青辉. 我国马铃薯茎尖培养脱毒和脱毒试管苗微繁研究进展[J]. 内蒙古农业科技(内蒙古农业职业教育专辑), 2001: 27-33.
- [4] 孙秀梅. 马铃薯茎尖剥离脱毒效果的影响因素分析[J]. 中国马铃薯, 2006, 19(4): 226-227.
- [5] 卢翠华, 邱宏, 张丽莉, 等. 马铃薯组织培养原理与技术[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2009: 97.
- [6] 齐恩芳, 王一航, 张武, 等. 马铃薯茎尖培养方法优化研究[J]. 中国马铃薯, 2007, 21(4): 200-202.
- [7] 李凤云. 马铃薯茎尖脱毒效果影响因素的研究[J]. 中国马铃薯, 2008, 22(4): 201-204.
- [8] 刘卫平, 李玉华, 孙秀梅, 等. 马铃薯离体茎尖生长点对几种培养因子的生长反应[J]. 中国马铃薯, 2001, 15(2): 81-82.
- [9] 司怀军, 王蒂. 我国马铃薯组织和细胞培养研究进展[J]. 中国马铃薯, 2000, 14(4): 220-223.